

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Kadi Rõuk

Plasmiidi pG20 replikatsiooni initsiatsioon tüves *Pseudomonas fluorescens*

PC20

Bakalaureusetöö

Juhendajad
PhD Merike Jõesaar
PhD Eve Vedler

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Plasmiidide üldisloomustus.....	5
1.1.1 Plasmiidide replikatsioon ning koopiaarvu kontroll	5
1.1.2 Plasmidi stabiilsuse tagamine	7
1.1.3 Plasmidi konjugatsioonimehhanismid	8
1.2 IS elemendid	9
1.2.1 IS1411	9
1.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i> tüvi PC20	11
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid	16
2.2.2 Bakteritüvede kasvatamine ning säilitamine	17
2.2.3 PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon.....	18
2.2.4 DNA geelelektroforees.....	19
2.2.5 Bakterirakkude elektroporatsioon	19
2.2.6 Plasmidi eraldamine ja DNA restriksioon	19
2.2.7 <i>repA</i> geenide <i>knockout</i> mutantide konstrueerimine	20
2.2.8 Bakterite konjugatsioon.....	21
2.3 Tulemused ja arutelu.....	21
KOKKUVÕTE	23
SUMMARY	24
KIRJANDUSE LOETELU.....	25

KASUTATUD LÜHENDID

Amp - ampitsilliin

bp – aluspaar (*base pair*)

Bp - bensüülpenitsiliin

DR - otsekordusjärjestus

dsDNA - kaheaahelaline DNA

Glc - glükoos

Inc - mitesobivusgrupp

IPTG – *isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid*

IS - insertsiooniline järjestus (*insertion sequence*)

IR - otsmine pöördkordusjärjestus (*inverted repeat*)

kbp – kiloaluspaar (*kilo base pair*)

Km – kanamütsiin

LB – Luria-Bertani sööde

MOB – *mobility*

MPF – *mating pair formation*

ori – replikatsiooni alguspunkt

oriT – konjugatsiooni alguspunkt

par süsteem – aktiivse jaotumise süsteem

Phe - fenool

pRNA – praimer RNA

Rep valk – replikatsiooni initsiaatorvalk

SSB – ühe-ahelalise DNAGA seonduv valk

TA – toksiin-antitoksiin

TOL plasmiid – tolueeni lagundav plasmiid

tra – transpordi geen

X-gal – 5-bromo-4-klooro-3-indolüül-β-D-galaktopüranosiid

SISSEJUHATUS

Insertsioonilised järjestused (ingl k. *insertion sequences*) ehk IS elemendid on lihtsad transponeeruvad DNA elemendid, mis võivad siseneda erinevatesse kohtadesse bakteri kromosoomis või bakteri plasmiidis DNAs. Mitmed IS elemendid omavad otstes väljapoole suunatud promootorjärjestusi, mis võivad aktiveerida geene, mille kõrvale taoline IS element inserteerub. Üheks selliseks IS elemendiks on *IS1411*.

Pseudomonas fluorescens tüves PC20 on kolm plasmidi - pNAH20, pPHE20 ning pG20. Plasmiid pG20 sisaldab kahte erineva järjestusega *repA* geeni, millest *repA1* ette on inserteerunud *IS1411* element.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida plasmidi pG20 replikatsiooni initsiatsiooni eest vastutavate valkude RepA1 ning RepA2 rolli. Selles plasmiidis on *repA1* geeni ette inserteerunud *IS1411* element selliselt, et tema väljapoole ulatuv otsmine promootor võiks aktiveerida *repA1* geeni. Kahe teise sarnase järjestuse ja ülesehitusega plasmidi (pD2RT ja pGRT1) puhul on näidatud, et replikatsiooni initsiatsioonil on *repA1* geeni homoloog inaktiivne.

Tänan Eve Vedlerit ja Merike Jõesaart juhendamise, abi ning nõuannete eest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Plasmiidide üldiseloostus

Plasmiidid on ekstrakromosomaalsed DNA elemendid, mis üldjuhul esinevad kovalentselt suletud tsirkulaarsete molekulidena (Kado, 1998). Lisaks rõngas DNA molekulidele on plasmiidide seas täheldatud ka lineaarseid vorme, mis on iseloomulikud näiteks *Rhodococcus*'e esindajatele (Fetzner jt., 2007). Plasmiidide suurus on vägagi erinev, jäädes 300 aluspaari (bp) kuni 2400 kiloaluspaari (kbp) vahele. Plasmiidid omavad kindlat koopiaarvu peremeesrakus – kui väikesed plasmiidid esinevad peremehes väga mitmes eksemplaris, siis suuri plasmiide võib olla üks või kaks koopiat raku kohta (Kado, 1998). Plasmiide on leitud kõigest kolmest eluslooduse domeenist: arhedest, bakteritest ning eukarüootidest (del Solar jt., 1998). Plasmiide iseloomustab võime iseseisvalt, peremehest sõltumatult replitseeruda ning osadel plasmiididel on võime kanduda konjugatsiooni käigus ühest rakust teise. Tänu konjugatsioonile on plasmiidid võimelised vabalt liikuma erinevate bakteripopulatsioonide vahel (del Solar jt., 1998) (Pemberton ja Schmidt, 2001).

Plasmiidid annavad oma peremeesorganismile teatavaid eeliseid ümbritsevas keskkonnas ellujäämiseks ning uute tingimustega kohanemiseks. Rakkude ellujäämist võivad soodustada mitmed plasmiidide poolt määratud omadused:

- 1) resistentsus antibiootikumide, raskemetallide, UV, faagide ja bakteriotsiinide vastu;
- 2) energia metabolism (süsivesikute, orgaaniliste hapete katabolism ning aminohapete, vitamiinide anabolism);
- 3) virulentsus, patogeensus ning sümbioos;
- 4) levitamine ja säilitamine (piilide süntees, kemotaksis) (Kado, 1998).

1.1.1 Plasmiidide replikatsioon ning koopiaarvu kontroll

Plasmiididel on replitseerumiseks kolm erinevat mehhanismi:

- 1) replikatsioon teeta mudeli järgi;
- 2) ahelate teisaldamise kaudu;
- 3) läbi veereva ratta mehhanismi.

Teeta mudelit on enim uuritud gram-negatiivsetel bakteritel, kuid seda esineb ka gram-positiivsetest mikroobidest isoleeritud plasmiididel. Replikatsiooni käigus toimub DNA ahelate lahtisulamine, vabanenud otstele praimer RNA (pRNA) süntees ning DNA süntees läbi praimer pikendamise. Kogu protsess saab alguse *ori*'lt ehk replikatsiooni alguspunktist. *ori* on väike plasmidi ala, mis hõlmab endas olulisi iseseisvaks replitseerumiseks vajalikke *cis*-toimivaid elemente. Replikatsioon teeta mudeli järgi saab alata nii ühelt-, kui ka mitmelt *ori*'lt ning võib toimuda nii ühe- kui ka kahesuunaliselt (del Solar jt., 1998). Et replikatsioon saaks toimuda, on vajalik plasmidi poolt kodeeritud Rep valgu ehk initsiaatorvalgu seondumine iteronidega. Iteronid on *ori* piirkonnas asuvad kordusjärjestused, mis on vajalikud replikatsiooni alustamiseks ning kontrolliks (Chattoraj, 2000). Ahelate lahtisulamise eest vastutab kromosomaalselt kodeeritud DnaA, mis seostub spetsiifiliselt DnaA-boksiga ning hõlbustab seeläbi DNA ahelate lahtisulamist. DNA süntees on ühel ahelal pidev (juhtiv ahel) ning teisel katkendlik (lohisev ahel) (del Solar jt., 1998).

Ahela teisaldamise mehhanismi (*Strand Displacement Replication*) abil replitseeruvad plasmiidid on laia peremeesringiga ning kuuluvad üldjuhul IncQ mittesobivusgruppi. Selle perekonna liikmed vajavad DNA replikatsiooni initsiatsiooniks kolme plasmidi poolt kodeeritud valku – RepA, RepB ja RepC. Erinevalt eelpool kirjeldatud mudelist ei vaja ahela teisaldamise mehhanism kromosomaalselt kodeeritud valku DnaA. Selle funktsioon on täidetud eelpool nimetatud Rep valkude poolt. Tänu kromosomaalselt kodeeritud faktorite puudumisele omavad IncQ perekonda kuuluvad plasmiidid laia peremeesbakterite valikut. Replikatsioon toimub DNA ahelatel pidevalt ning mõlemas suunas, tõrjudes välja komplementaarse ahela (del Solar jt., 1998).

Veereva ratta mudeliga (*Rolling-Circle Replication*) replitseeruvad plasmiidid on tavaliselt väikesed, alla 10 kbp. Replikatsioon toimub ühesuunaliselt ning juhtiva ja mahajääva ahela süntees on teineteisest sõltumatud. Plasmiidse DNA replikatsiooni alguses tehakse Rep valgu poolt DNA pluss-ahelasse katke. Tulemuseks on vaba 3' hüdroksüülrühm, mida kasutatakse praimerina juhtiva ahela sünteesiks. Uue ahela sünteesiks on vaja peremeesraku DNA polümeraas III, ühe-ahelalise DNAGA seostuvat valku ehk SSBd ning helikaasi. Uus sünteesitud positiivne ahel jääb kovalentselt seotuks väljatõrjutud pluss ahelaga. Juhtiva ahela replikatsiooni lõpp-produktiks on kaheaheelaline DNA (dsDNA) molekul, mille moodustavad vana miinus ahel ning uus sünteesitud pluss ahel. Lisaks on dsDNAGA seotud üheaheelaline DNA (vana positiivne ahel), millele sünteesitakse komplementaarne DNA (del Solar jt., 1998).

Igal plasmiidil on peremeesorganismis kindel koopiaarv. See saavutatakse plasmidi poolt kodeeritud kontrollelementide poolt, mis reguleerivad replikatsiooni initsiatsiooni (del Solar jt., 1998). Replikatsiooni üheks kontrolli võimaluseks on Rep valgu ning iteronide hulga kontroll *ori* piirkonnas. Replikatsiooni alguspunkti küllastumine Rep valkudega on replikatsiooni alguseks vajalik, kuid lisa iteronid viivad replikatsiooni peatumiseni ning plasmiidide koopiaarvu vähenemiseni (Chattoraj, 2000). See näitab, et iteronide hulgast sõltub plasmidi replikatsiooni tase (Park jt., 2001). Teises kontrollmehhanismis on iteronid samuti olulisel kohal. Iteronid on võimelised moodustama paare tänu nende seondumisele Rep valkudega. Antud protsess omab nimetust *handcuffing* (ingl. k), omades olulist rolli replikatsiooni initsiatsiooni takistamisel. Iteron-iteron kompleksi moodustumine intensiivistub, mida enam on sidemeid Rep valkudega ning väheneb, kui on jõutud küllastumiseni (Das ja Chattoraj 2004).

1.1.2 Plasmidi stabiilsuse tagamine

Suured plasmiidid esinevad peremeesrakus alati vaid mõne koopiaga ning seetõttu on suur oht, et raku jagunemisel võib plasmiid kaotsi minna (Sengupta ja Austin, 2011). Plasmidi säilumise eest vastutavad mitmed mehhanismid: 1) aktiivne jaotumine, 2) postsegregatsiooniline tapmine ning 3) multimeeride lahutamise mehhanism (Zielenkiewicz ja Ceglowski, 2001).

1) Aktiivne jaotumine (ingl k. *active partitioning*) vastutab madala koopiaarvuga plasmiidide võrdse jaotumise eest tütarakkudesse (Ebersbach ja Gerdes, 2005). See mehhanism vähendab plasmiidivabade bakterite tekkimise võimalust (Williams ja Thomas, 1992). Aktiivse jaotumise süsteem peab tagama plasmiidide seondumise *cis*-toimelise järjestusega ning plasmiidide eraldamise jaguneva raku eri pooltele (Zielenkiewicz ja Ceglowski, 2001). Selle eest vastutab plasmidi kodeeritud *par* (jaotumise) süsteem, mis sisaldab valku ParA (ATPaas), spetsiifilist DNAGA seonduvat valku ParB ning *cis*-toimivat järjestust, millega ParB seondub (Dmowski jt., 2006) (Sengupta ja Austin, 2011).

2) Multimeeride lahutamise mehhanism (ingl k. *multimer resolution*). Homoloogne rekombinatsioon bakteris olevate plasmiidide vahel pärast replikatsiooni või selle käigus võib viia oligomeeride tekkeni. See takistab plasmiidide ühtlast jaotumist jagunevate tütarakkude vahel. Täpseks jagunemiseks on vajalik multimeeride lahutamine monomeerideks enne raku

jagunemist. Seda viivad läbi järjestuse spetsiifilised rekombinaasid (resolvaasid) (Sengupta ja Austin, 2011) (Dmowski jt., 2006).

3) Postsegregatsiooniline tapmine (ingl k. *postsegregational killing*) on toksiin-antitoksiin (TA) mehhanism, mis põhjustab raku programmeeritud surma (Sengupta ja Austin, 2011). Antud mehhanism koosneb stabiilsest valgust, mis toimib toksiinina ning labiilsest valgust, mis toimib antitoksiinina. Kui rakk sisaldab plasmiidi, siis toimub toksiini inaktivatsioon antitoksiini poolt. Kui aga tütarrakku plasmiidi ei sattunud, toimub antitoksiini lagundamine peremeesraku ensüümide poolt, uut antitoksiini ei sünteesita, ning toksiin põhjustab peremeesraku surma (Hayes, 2003).

1.1.3 Plasmiidi konjugatsioonimehhanismid

Paljudel plasmiididel on omadus konjugatsiooni abil ise ühest rakust teise üle kanduda (Pemberton ja Schmidt, 2001). Konjugatsioonil saavutatakse doonor- ja retsipientraku vahel kontakt ning saab toimuda DNA ülekanne. Rakk-rakk kontakti saavutamine on konjugatsiooni juures tähtis protsess (Firth jt., 1996). Selle jaoks on plasmiidil *tra* ehk transpordi geenid, mille ekspresseerumisel hakkab rakk tootma pikki, õhukesi piiliseid (*sex pili*) (Pemberton ja Schmidt 2001). Piili ots seostub retsipientraku retseptoriga ning kaks rakku tõmmatakse teineteisega kokku. DNA ülekanne algab kindlast *oriT* piirkonnast, kus plasmiidsesse DNAsse tehakse katke. Edasi transporditakse plasmiid periplasmasse ning sealt retsipientrakku, kuhu kandub üheahelaline DNA (Kalkum jt., 2002). Järgmisena toimub nii retsipient- kui ka doonorrakus komplementaarse ahela süntees ning lineaarse DNA muutmine tsirkulaarseks DNAs. Mõlemad protsessid viiakse läbi peremeesraku ensüümide abil (Firth jt., 1996).

tra geenid (ülekandegenid) saab jaotada kaheks: MOB (tuleneb sõnast mobiilsus) ja MPF (ingl k. *mating pair formation*, membraanseotud paari moodustumine) geenid. MOB geenid on hädavajalikud plasmiidi konjugatiivseks ülekandeks, võimaldades konjugatiivse DNA ümbertöötlemist (Smillie jt., 2010). Lisaks MOB komponentidele on plasmiidi ülekandeks vajalik MPF kompleks, mis on tarvilik piilide tootmiseks (Gilmour jt., 2003). Plasmiid, mis kodeerib nii MOB kui ka MPF geene on võimeline ise ühest rakust teise üle kanduma ning sellist plasmiidi nimetatakse konjugatiivseks plasmiidiks. Kui aga plasmiid pole võimeline ise MPF geene kodeerima ning kasutab ülekandeks teise, rakus samaaegselt esineva plasmiidi (abiplasmiid) MPF geene, nimetatakse antud plasmiidi mobiliseeritavaks (Smillie jt., 2010).

Lisaks plasmiidide mobilisatsioonile võib retsipientrakku viia ka muid DNA järjestusi. See osutub võimalikuks, kui konjugatiivsesse plasmidi viia järjestusi bakteri kromosoomist, transposoonidest või teistest plasmiididest (Firth jt., 1996). Konjugatiivne protsess võimaldab bakteril transportida DNAd mitte ainult teistesse bakteritesse, vaid ka seene-, taime- ja ka loomarakku. Seega on konjugatsioon looduses oluline protsess (Kalkum jt., 2002).

1.2 IS elemendid

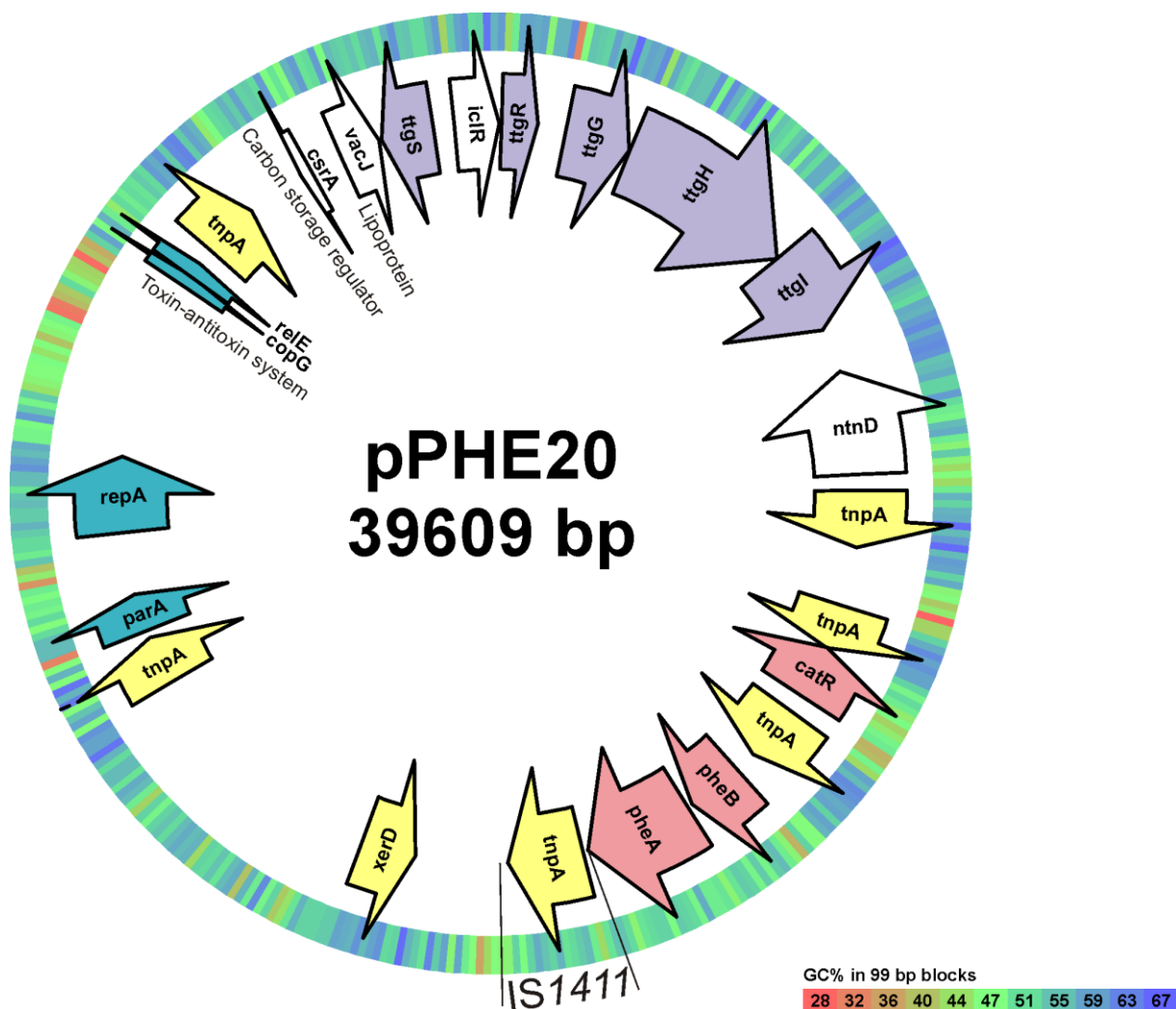
Insertsioonilised järjestused (ingl k. *insertion sequences*) ehk IS elemendid on lihtsad transponeeruvad DNA elemendid (Kallastu jt., 1998), mis võivad siseneda erinevatesse kohtadesse bakteri kromosoomis või bakteri plasmiidis DNAs (Heinaru, 2012). IS elemendi puhul on tegu väikese, 800–2500 bp suuruse DNA segmendiga, mida võib leida suure hulga bakterite genoomidest (Kallastu jt., 1998; Mahillon ja Chandler, 1998). Insertsioonilised järjestused on geneetiliselt kompaktsed, sisaldades vaid neid geene, mis on vajalikud transpositsiooniks ja selle regulatsiooniks (Mahillon ja Chandler, 1998; Heinaru, 2012). IS elemendid kodeerivad valku transposaasi, mis seondub ISi otstes olevate kordusjärjestuste ehk IR järjestustega. Transposaas põhjustab DNA mõlema ahela katkemist, mille tulemusel IS element nukleotiidi täpsusega välja lõigatakse. Pärast välja lõikamist saab selle transportida uude DNA molekuli või sama molekuli uude piirkonda. Insertsioonil tekivad märklau DNA 2–13- nukleotiidsete järjestuste samasuunalised otsekordusjärjestused ehk DR-järjestused mõlemal pool IS elementi. IS elemendid saavad oma genoomi paljundada sõltumatult genoomi üldisest replikatsioonist ning seetõttu võib nende koopiaarv genoomis sõltuvalt organismist varieeruda (Heinaru, 2012). Lisaks eelnevale on mitmete IS elementide omaduseks võime aktiveerida naabergeenide ekspressiooni. Sellisteks elementideks on näiteks IS1, IS2 ning IS5 (Mahillon ja Chandler, 1998).

1.2.1 IS1411

IS1411 on insertsiooniline järjestus, mis kuulub ISL3 perekonda. Antud järjestus avastati *Pseudomonas* sp. tüvest EST1001 pärit fenooli lagundamist kodeeriva *pheBA* operoni kõrvalt (Joonis 1A). IS1411 omab 24 aluspaari pikkuseid IR järjestusi, mis on homoloogilised teiste ISL3 perekonda kuuluvate IS elementidega. Inserteerumisel märklau DNAsse tekivad seda

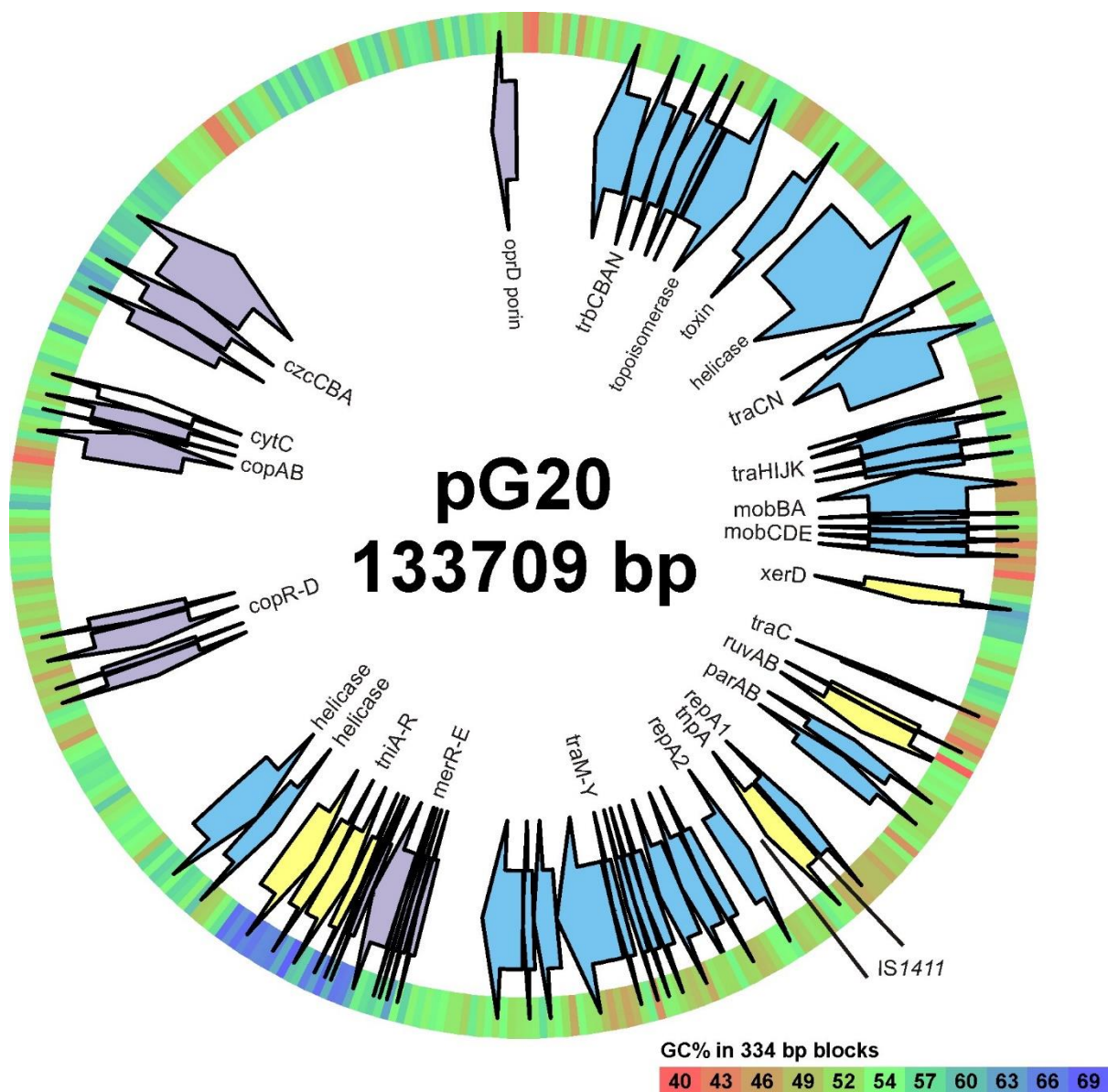
tüüpi IS elementidel 8 aluspaarilised DR-järjestused. IS1411 sisaldab 433 aminohappe suurust valku kodeerivat *tnpA* geeni. See kodeerib transponeerumiseks vajalikku ensüümi transposaaasi (Kallastu jt., 1998). IS1411 element omab võimet aktiveerida geene tänu väljapoole ulatuvatele promootoritele elemendi vasakus otsas (Joonis 2) (Kallastu jt., 1998). *Pseudomonas putida* tüves PaW85 näidati *pheBA* operoni transkriptsiooni aktivatsiooni IS1411 elemendi funktsionaalsete promootorite abiga (Joonis 1B). Selleks viidi pEST1414 plasmiid, mis sisaldas promootorita *pheBA* geene, *P. putida* tüvesse PaW85, ning fenooli sisaldaval minimaalsöötmel selekteeriti välja bakterid, kes olid omandanud võime *pheBA* operoni abil fenooli lagundama hakata. Enamikel juhtudel tekkis promootor *pheBA* operoni ette erinevate mutatsioonide tulemusena. Ühel juhul aga leiti, et ülevalpool *pheA* geeni oli inserteerunud IS1411, andes antud operonile funktsionaalse promootori, mis aktiveeris transkriptsiooni. Tekkinud plasmiid nimetati pINS113 (Joonis 1B) (Kasak jt., 1997).

Joonis 1. *pheBA* operoni ning IS elementide asukoht pAT1140 plasmiidis. *pheB* ja *pheA* geene ümbritsevad kaks IS elementi, IS1411 ja IS1472. *pheBA* operoni promootor asub ülevalpool IS1472 elementi (*p_i*). Transkriptsioon toimub noolega näidatud suunas. (B) *pheBA* operoni ning IS1411 elemendi asukoht plasmiidides pEST1414 ja pINS113. Joonisel on näidatud *pheBA* operoni plasmiidil pEST1414, mille ees puudub promootor. Plasmiidil pINS113 on näha *pheBA* geenide ette hüpanud IS1411 elementi, mis annab *pheBA* geenidele promootori (Kallastu jt. 1998).



Joonis 3. pPHE20 plasmidi illustreeriv joonis. pPHE20 üheks omaduseks on fenooli lagundamine. See on tagatud *pheBA* operoni ning *catR* geeni poolt, mis on joonisel tähistatud roosade nooltega. Plasmidis leidub veel hulgaliselt horisontaalse geeniülekanega seotud geene (tähistatud kollaste nooltega) ja IS elemente, k.a. *IS1411* (joonisel näidatud kahe musta joone vahel). Lisaks on plasmidil veel kodeeritud replikatsiooniks ja stabiilsuseks vajalikud geenid, mis on tähistatud siniste nooltega, ning tolueni efluks-pumpa kodeerivad geenid, mis on tähistatud lillade nooltega.

Lisaks varem kirjeldatud plasmiididele on hiljuti avastatud samast tüvest ka kolmas, 133709 bp suurune plasmiid pG20 (Joonis 4). Erinevalt teistest, sama tüve plasmiididest, ei ole pG20 funktsioon veel täpselt teada, plasmidil on kodeeritud mitmed raskemetallide pumbad (avaldamata andmed). Plasmidil on kaks erineva järjestusega *repA* geeni, millest *repA1* ette on inserteerunud *IS1411* element.



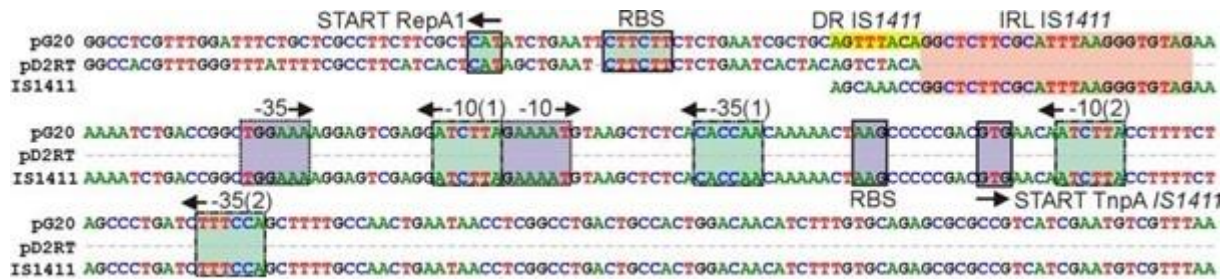
Joonis 4. pG20 illustreeriv joonis. Kuigi pG20 plasmidi täpne funktsioon pole teada, on seal kodeeritud mitmed raskmetallide pumbad (*cop* ja *czc* geenide poolt kodeeritud, joonisel lillade nooltega tähistatud). *repA1* geeni ette inserteerunud *IS1411* element on näidatud kahe musta joone vahel. pG20 selgroo geenid on joonisel esitatud siniste nooltega.

Plasmidi pG20 selgroog (replikatsiooniks, stabiilsuseks ja ülekandeks vajalikke gene kodeeriv piirkond plasmidis) on väga sarnane *Pseudomonas migulae* tüve D2RT TOL plasmidi pD2RT selgrooga (avaldamata andmed). Erinevalt pG20st aga pD2RT plasmidil *repA1* ees *IS1411* elementi ei ole (Joonis 5). Jekaterina Jutkina leidis oma doktoritöös, et pD2RT plasmidi replikatsiooniks on hädavajalik ainult *repA2*, *repA1* osutus antud peremehes mittefunktsionaalseks (Jutkina jt., 2013).



Joonis 5. pD2RT geneetiline kaart. Jekaterina Jutkina doktoritöö (2013) käigus koostatud geenikaart. Antud plasmiid sisaldab sarnaselt pG20-le kahte erineva järjestusega *repA* geeni (joonisel vastav piirkond märgitud punase ringiga). Oranžide nooltega on tähistatud tolueeni lagundamiseks vajalikud geenid, siniste nooltega horisontaalses geeniülekanDES osalevad geenid, kollaste nooltega plasmidi selgroo moodustavad geenid.

Plasmiidis pG20 on IS1411 inserteerunud *repA1* geeni ette sel moel, et tema väljapoole suunatud promootorid võiks aktiveerida *repA1* geeni transkriptsiooni (Joonis 6).



Joonis 6. IS1411 elemendi asukoht pG20 plasmidi *repA1* geeni ees. Joondatud on plasmiidide pG20 ja pD2RT *repA1* geeni algused ja geenist ülespoole jäävad alad. IS1411 järjestusena on kasutatud plasmidis pPHE20 olevat järjestust alates otsmisest otsekordusjärjestusest DR. *repA1* ja *tnpA* geenide translatsiooni alguspunktid on näidatud START tähisega, ribosoomi seondumissaidid RBS tähisega, translatsiooni suund on näidatud noolega. Promootorite konserveerunud boksid on tähistatud -10 ja -35 tähistega, nende suunad on näidatud nooltega, IS1411väljapoole suunatud kaks promootorit on tähistatud vastavalt (1) ja (2). Helerohelise sisuga kastid on *repA1* geeni ekspressiooni kontrollelemendid ja lilla sisuga kastid on *tnpA* omad. Kollaselt on varjutatud IS1411 otsmine otsekordusjärjestus DR, roosalt on varjutatud IS1411 vasakpoolne otsmine pöörkordusjärjestus IRL (Inverted Repeat Left).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Jekaterina Jutkina (2013) näitas oma doktoritöös, et pD2RT plasmidi replikatsioonil *Pseudomonas migulae* tüves D2RT, omades kahte *repA* geeni, funktsioneerib ainult *repA2* ning selle geeni katkestamise tagajärjel D2RT tüvi kaotas plasmidi. *repA1* seevastu osutus replikatsiooni läbiviimisel antud peremehele mittehädavajalikuks, kuna selle geeni katkestamine plasmidi säilumist ei mõjutanud. Käesoleva töö eesmärgiks on konstrueerida *P. fluorescens* tüve PC20 *repA1* ja *repA2* negatiivsed mutandid ning teha kindlaks, kas peremeestüves PC20 on *repA1* geen aktiveeritud tänu IS1411 insertioonile ning RepA1 valk on võimeline läbi viima plasmidi pG20 replikatsiooni.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi või plasmiid	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
PC20	Metsiktüvi	Heinaru jt., 2000
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
CC118λpir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Amp) recA1 λpir</i> faagi lüsogeen	Herrero jt., 1990
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rspL20 Xyl-5 mtl-1</i>	Boyer, Roulland-Dussoix, 1969
Plasmiidid		
pTZ57R/T	kloneerimisvektor (Amp)	Thermo Scientific
pUTmini-Tn5 Km2	mini-T5 Km2 vastuvõttev plasmiid (Amp, Km)	de Lorenzo jt., 1990

pGP704L	suitsiidvektor (Amp)	Pavel jt., 1994
pRK2013	konjugatiivset ülekannet abistav plasmiid	Figurski, Helinski, 1979
repA1/pTZ57R	PCRga amplifitseeritud <i>repA1</i> geen PC20 tüvest on kloonitud pTZ57R/T vektorisse	Käesolev töö
pTZ57RΔrepA1::km	<i>repA1</i> geen pTZ57R/T vektoris lõigatuna Eco52I ja NcoI, on katkestatud <i>Km</i> geeniga, mis on pärit pUTmini-Tn5 Km2-st	Käesolev töö
pGP704ΔrepA1::km	ΔrepA1::km vektorist pTZ57RΔrepA1::km kloonitud plasmidi pGP704L restriktasidega SacI ja SalI	Käesolev töö
repA2/pTZ57R	PCRga amplifitseeritud <i>repA2</i> geen PC20 tüvest on kloonitud pTZ57R/T vektorisse	Käesolev töö
pTZ57RΔrepA2::km	<i>repA2</i> geen pTZ57R/T vektoris, lõigatuna Eco72I ja Esp3I, on katkestatud <i>Km</i> geeniga, mis on pärit pUTmini-Tn5 Km2-st	Käesolev töö
pGP704ΔrepA2::km	ΔrepA2::km vektorist pTZ57RΔrepA2::km kloonitud plasmidi pGP704L restriktasidega SacI ja SphI	Käesolev töö

2.2.2 Bakteritüvede kasvatamine ning säilitamine

Bakterirakke kasvatati LB (Miller, 1972) vedelsöötmes ning tardsöötmele temperatuuridel 30°C (*P. fluorescens*) ning 37°C (*E. coli*). Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil (180 pööret/min) Mikroobide kasvu selekteerimiseks lisati söötmetesse antibiootikume: ampitsilliin (Amp 150 µg ml⁻¹), bensüülpenitsilliin (Bp 1,5 mg ml⁻¹) ning kanamütsiini (Km 50 µg ml⁻¹). Kolooniade sini-valge testi läbi viimiseks (*lacZ* geeni ekspressiooni tuvastamiseks) lisati LB söötmele 0,5 mM IPTGd ja 100 µg ml⁻¹ X-gali. Transkonjugante säilitati M9 baasil (Adams, 1959) valmistatud minimaalsöötmele, mis sisaldas M9 ja mikroelementide lahust (Bauchop ja Elsdén, 1960) ning süsinikuallikana 0,2% glükoosi (Glc) ja Km.

2.2.3 PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon

Soovitud geenifragmentide amplifitseerimiseks kasutati PCR meetodit. Reaktsioonisegu (üldmaht 25 µl) sisaldas: 1 x PCR puhver [75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20], 0,2 mM lõppkontsentratsiooniga igat nukleotiidi (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2,5 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl₂, kumbagi praimerit 10 pmol, 0,5 U termostabiilset Taq DNA polümeraasi (*Thermo Scientific*) ning 1 µl märklaud DNAd või rakke ning lõppmahuni destilleeritud vett.

Reaktsioon viidi läbi Eppendorf Masterscycler PCR masinas järgmistel tingimustel:

1. Esialgne denaturatsioon 96°C 2 minutit
2. DNA kaksikahelate denaturatsioon 94°C 45 sekundit
3. Praimerite seondumine DNAGA vastavatel temperatuuridel 45 sekundit (temperatuurid tabelis 2)
4. DNA süntees 72°C kuni 3 minutit (Tabel 2)
Etappe 2-4 korratakse 32 korda.
5. Lõppekstensioon 72°C 10 minutit.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Praimer	Praimeri järjestus 5'→3'	Seondumist°	Sünteesi aeg	Viide
KmSac	CAGGAGCTCGTTCGATTATTCACAAAGCC	54°C	1min	Hõrak jt., 2004
RepA1F uus	GCTCACACACCTTACGGACA	55°C	3min	Käesolev töö
RepA1R	GTTGCCGTCATTTCTGAGGC	55°C	3min	Käesolev töö
RepA1 seest	ACGGGTAGAGTTTGTGGCAG	55°C	3min	Käesolev töö
RepA2F	GGAACGCGGAGCAGAACG	55°C	3min	Käesolev töö
RepA2R	TCGCCGACGCTTTTGTCG	55°C	3min	Käesolev töö
RepA2 seest	ACTTGTACCATCGATGCT	55°C	3min	Käesolev töö
KmOc	TCGAGCAAGACGTTTCCC	54°C	1min	Saumaa jt., 2006
LuxAB ylemine	CTTCCTTCTCACTTATCAGCC	54°C	1min	Geneetika õppetool
LuxAB sisemine	CAGTCCATTAAGGCTCGGC	54°C	1min	Geneetika õppetool

2.2.4 DNA geelelektroforees

PCR produktide kontrollimiseks ning visualiseerimiseks kasutati geelelektroforeesi. DNA fragmentide lahutamiseks kasutati 0,8% agarosgeeli 1 x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumpromiidi ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$). 5 μl proovile lisati 1 μl foreesivärvi (0,04% broomfenooli lahus 50% glütseroolis) ning kanti agarosgeelile. DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati *GeneRuler 1kb DNA ladder* DNA molekulmassi markerit (*Thermo Scientific*). Elektroforees toimus 1 x TAE puhvris 100 V juures 15 minutit. DNA olemasolu hinnati visuaalselt UV kiirguse abil.

2.2.5 Bakterirakkude elektroporatsioon

Elektroporatsiooni kasutati plasmiidse DNA sisestamiseks rakkudesse. Elektroporatsiooniks kompetentsete *E. coli* DH5 α ja CC118 λ pir rakkude saamiseks lahjendati LB-vedelsöötmes üleöö kasvanud kultuure optilise tiheduseni $A_{580}=0,1$ ja kasvatati loksutil 1,5-2 h (tiheduseni $A_{580}=0,9-1,5$). Söötmes olevad rakud tsentrifuugiti (13400 pööret min^{-1}) kokku ning sööde eemaldati. Rakud jahutati jääl ja pesti kaks korda 500 μl külma veega ning kaks korda 200 μl 10% glütseroolilahusega, lõpuks rakud suspendeeriti 50 μl 10% glütseroolilahuses.

Kompetentsetele rakkudele lisati 2,5 μl destilleeritud vees lahustatud DNAd. Rakud pipeteeriti elektroporatsiooni küvetti ja elektroporeeriti BioRad elektroporaatoriga 2500 V suurusel pingel. Seejärel rakud pipeteeriti 1,5 ml LB söötmesse ja kasvatati tund aega loksutil 37°C juures. Rakud plaaditi selektiivsöötmele.

2.2.6 Plasmidi eraldamine ja DNA restriksioon

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati firma Favorgen Biotech Corp plasmidi eraldamise komplekti *FavorPrepTM Plasmid Extraction Kit* ja järgiti tootja etteantud protokoll. DNA restriksiooniks kasutati firma „*Thermo Scientific*“ restriктаase ning reaktsioonid viidi läbi vastavalt tootja protokollile. Tulemusi kontrolliti geelelektroforeesil.

2.2.7 *repA* geenide *knockout* mutantide konstrueerimine

Replikatsiooni eest vastutavate *repA1* ning *repA2* geenide *knockout* mutantide konstrueerimiseks esmalt amplifitseeriti *repA* gene sisaldavad DNA regioonid PCR abil *P. fluorescens* tüvest PC20. Geenide amplifitseerimisel kasutati RepA1Fuus/RepA1R ning RepA2F/RepA2R praimereid (Tabel 2). Amplifitseeritud PCR produktid *repA1* (1800 bp) ja *repA2* (2362 bp) ligeeriti pTZ57R/T vektorisse, kasutades *InsTAclone PCR Cloning Kit*'i (*Thermo Scientific*). Ligeerimiseks amplifitseeritud PCR produkt segati kokku ligaasi reaktsioonisegus mahus 20 µl, mis sisaldas lisaks PCR produktile ja vektorile ühekordset ligaasi puhvrit firmalt *Thermo Scientific*, 1 mM lõppkontsentratsioonis ATPd ning 0,5 ühikut T4 ligaasi (*Thermo Scientific*). Reaktsioon toimus üleöö temperatuuril 16-20°C. Ligaasisegu sadestati 0,1 kordses mahus 5 M NaCl ja 2,5 kordses mahus 96% etanooli lahusega temperatuuril -20°C 15 minutit. Sade tsentrifuugiti põhja (13400 pööret min⁻¹) 15 minutit 4°C juures ning pesti 75% etanooliga. Saadud sade kuivatati 37°C juures. Sade võeti üles 5 µl destilleeritud vees ning viidi elektroporatsioonil kompetentsetesse *E. coli* DH5α rakkudesse (p.2.2.5). Elektroporeeritud rakud külvati selektiivsele LB-Amp tardsöötmel (p.2.2.2), mis sisaldas sini-valge testi jaoks IPTGd ja X-gali ning kasvatati 37°C juures üleöö. Vektorisse kloneeritud fragmentide õigsust kontrolliti *repA1* ja *repA2* spetsiifiliste praimeritega (Tabel 2). Õigetest kloonidest eraldati *repA* gene sisaldavad vektorid (p.2.2.6).

Katkestusmutantide tegemiseks vektoreid *repA1/pTZ57R* ja *repA2/pTZ57R* lõigati restriктаasidega, vastavalt Eco52I/NcoI ning Eco72I/Esp3I. Umbes 1 kb suurused katkestused mõlemas geenis asendati *Km* geeniga. Selleks amplifitseeriti *Km* fragment pUTmini-Tn5 *Km2* plasmiidilt, kasutades *KmSac* praimerit (Tabel 2). Amplifitseeritud *Km* fragmenti lõigati Ecl136II ja DpnI restriктаasidega. Lõigatud vektoritele *repA1/pTZ57R* ja *repA2/pTZ57R* tehti Klenowi töötlus. Selleks lisati reaktsioonisegule 1 ühik *Thermo Scientific* Klenowi fragmenti ja 1 µl 1 mM dNTPd ning inkubeeriti 30 minutit temperatuuril 37°C. Lõigatud *Km* fragmendile tehti aluselise fosfataasi töötlus fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*). Selleks lisati restriksioonisegule üks ühik ensüümi FastAPd ning inkubeeriti 15 minutit temperatuuril 37°C. FastAP inaktiveeriti, hoides proovi 10 minutit temperatuuril 75°C. Seejärel restriksioonisegud sadestati, viidi läbi ligeerimine ning elektroporeerimine kompetentsetesse *E. coli* DH5α rakkudesse nagu eelnevalt kirjeldatud. Kontrollitud vektorid pTZ57RΔ*repA1::km* ja pTZ57RΔ*repA2::km* eraldati ning restrikteeriti vastavalt, SacI/Sall ning SphI/SacI. Selle tulemusel eraldati plasmiidist *Km* geeniga lõhutud *repA* geen. Restrikteeritud fragmendid ligeeriti lahti lõigatud suitsiidvektorisse pGP704 L, mis oli samuti

lõigatud vastavalt SacI/SalI ning SphI/SacI restriктаasidega. Vältimaks restriктаasidega avatud kloneerimisvektori kokku ligeerumist, viidi läbi aluselise fosfataasi töötlus. Ligeeritud vektorid sadestati ja elektroporeeriti kompetentsetesse *E. coli* CC118λpir rakkudesse. Konstruktide pGP704ΔrepA1::km ning pGP704ΔrepA2::km õigsust kontrolliti PCR ja kontroll-lõikuste teel.

2.2.8 Bakterite konjugatsioon

Konstruktide pGP704ΔrepA1::km ning pGP704ΔrepA2::km viimiseks *E. coli* CC118λpir tüve rakkudest *P. fluorescens* PC20 tüve rakkudesse kasutati kolmikristamist ehk konjugatsiooni. Doonortüve (*E. coli* CC118λpir), mis sisaldas konjugatiivset plasmidi (pGP704 L, mis sisaldas meid huvitava geeni katkestust) ning helpertüve (*E. coli* HB101, mis sisaldas plasmidi ülekandeks vajalikku abistajaplasmiidi pRK2013) rakke kasvatati LB vedelsöötmes, kuhu oli lisatud plasmidi selektsiooniks vajalikku antibiootikumi Km ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) 37°C juures üleöö ning retsipienttüve (*P. fluorescens* PC20) rakke 30°C juures üleöö. Igast üleöö kasvanud tüvest lahjendati rakukultuurid LB-söötmesse tiheduseni $A_{580}=0,1$ ja kasvatati eksponentsiaalsesse kasvufaasi tiheduseni $A_{580}=0,6-0,8$. Seejärel segati helper-, doonor-, ja retsipienttüved kokku (igat tüve 100 μl) ning kanti LB-tardsöötmele ühte laiku ja kasvatati üleöö temperatuuril 30°C. Kogu üleöö kasvanud biomass suspendeeriti 1 ml 1 x M9 lahuses ning sellest 150 μl plaaditi Glc ja Km sisaldavale selektiivsöötmele transkonjugantide isoleerimiseks. Tekkinud kolooniad külvati edasi Glc ja Bp sisaldavale selektiivsöötmele, kontrollimaks homoloogilise rekombinatsiooni toimumist. Transkonjugante kontrolliti ka PCR abil RepA1F, RepA1R, RepA2R, RepA2F, RepA1seest, RepA2seest, LuxABylemine ning LuxABsisemine praimeritega, et kindel olla, et plasmidis pG20 on vastavalt *repA1* või *repA2* geen asendunud katkestatud variandiga.

2.3 Tulemused ja arutelu

Eve Vedleri poolt sekveneeritud ja assambleeritud *P. fluorescens* tüve PC20 plasmidi pG20 järjestuses täheldati kahe *repA* geeni olemasolu. Plasmidi pG20 selgroog (replikatsiooniks, stabiilsuseks ja ülekandeks vajalikke gene kodeeriv piirkond plasmidis) on väga sarnane *Pseudomonas migulae* tüve D2RT TOL plasmidi pD2RT selgrooga (avaldamata andmed).

Erinevalt pG20st puudub pD2RT plasmiidil *repA1* ees *IS1411* element. Jekaterina Jutkina (2013) doktoritöös läbiviidud katsetes selgus, et *P. migulae* tüve D2RT plasmidi pD2RT replikatsioonil on hädavajalik roll RepA2-1 ning *repA1* geen osutus antud plasmidi replikatsioonil antud peremehes mittefunktsionaalseks. Selgitamaks, kas sama olukord kehtib ka *P. fluorescens* tüve PC20 plasmidi pG20 puhul või on tänu *IS1411* insertioonile tekkinud promootor *repA1* geeni ees aktiveerinud selle geeni, konstrueeriti töö esimeses etapis kaks konstrukti, pGP704Δ*repA1*::*km* ning pGP704Δ*repA2*::*km*. Antud konstruktide saamiseks asendati *repA* geenides umbes 1 kb suurused piirkonnad *Km* geeniga ning ligeeriti pGP704 L plasmiidisse vektorisse. pGP704Δ*repA1*::*km* ning pGP704Δ*repA2*::*km* konstruktid elektroporeeriti *E. coli* CC118λpir rakkudesse ning seejärel viidi konjugatsiooni teel *P. fluorescens* PC20 rakkudesse. Konjugatsiooni tulemusena tekkisid transkonjugantidena kolooniad nii PC20*repA1*⁻ kui PC20*repA2*⁻ tüvedest, mõlemad sisaldasid plasmidi pG20, kus vastav *repA* geen oli homoloogilise rekombinatsiooni teel asendatud geeni mutantse vormiga.

Katsete tulemused näitasid, et nii *repA1* kui *repA2* geeni produktid on võimelised läbi viima *P. fluorescens* tüve PC20 plasmidi pG20 replikatsiooni initsiatsiooni. Antud töös saadud tulemused erinesid eelpool mainitud Jekaterina Jutkina (2013) doktoritöös esitatud tulemustest, kus hädavajalikuks osutus vaid RepA2. See võib viidata asjaolule, et erinevalt pD2RT plasmidist on plasmidis pG20 *repA1* ette inserteerunud *IS1411* element, mis võis antud geenile anda (antud tüves) funktsioneeriva promootori ning seeläbi *repA1* transkriptsiooni sisse lülitada. Taoline IS elemendi abil geeniekspressiooni sisselülitamine ei saa olla juhuslik, järelikult tekkis antud plasmidi puhul mingil ajahetkel vajadus funktsioneeriva *repA1* geeni järele. Kuna ühelgi pG20ga ülesehituselt ja järjestuselt sarnase plasmidi puhul, millel on samuti kaks *repA* geeni - peale pD2RT ka plasmidi pGRT1 tüvest *P. putida* DOT-T1E ning kontiig 065 tüvest *P. syringae* pv *glycinea* B076, mis ilmselt esindab plasmiidset järjestust (Jutkina, 2013) – ei ole *repA1* geeni ees *IS1411* leitud. Ka pGRT1 plasmidi puhul näidati samasugust olukorda nagu pD2RT puhul, kus funktsionaalseks osutus vaid *repA2* geeni homoloog (Molina jt., 2011). NCBI GenBank andmebaasis on *IS1411* järjestusi võimalik leida vaid paari *Pseudomonas* tüve genoomidest, samal ajal kui tüves PC20 on see element nii plasmidi pPHE20 koosseisus kui ka kahe koopiana kromosoomis (avaldamata andmed), seega võib oletada, et suure tõenäosusega toimus selle IS elemendi insertioon plasmidi pG20 *repA1* geeni ette just tüves PC20.

KOKKUVÕTE

Pseudomonas fluorescens tüvi PC20 on eraldatud Ida-Eesti fenoolse reostusega jõeveest. Tüvi PC20 omab kolme plasmidi - pNAH20, pPHE20 ja pG20. Plasmid pG20 sisaldab kahte erineva järjestusega *repA* geeni, millest *repA1* ette on inserteerunud IS1411 element.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida pG20 replikatsiooni initsiaatorvalkude RepA1 ning RepA2 rolli plasmidi replikatsioonil *Pseudomonas fluorescens* tüves PC20. Selleks konstrueeriti kaks tüve, kus pG20 plasmidis katkestati ükshaaval *repA1* ning *repA2* geenid ning vaadeldi selle mõju plasmidi säilimisele peremehes.

Tulemuste põhjal tehti järgnevad järeldused:

- *repA1* geeni katkestamine ei mõjuta funktsionaalse *repA2* olemasolul pG20 plasmidi replikatsiooni peremeestüves PC20;
- *repA2* geeni katkestamine ei mõjuta pG20 plasmidi replikatsiooni peremeestüves PC20 funktsionaalse *repA1* olemasolul;
- võrreldes Jekaterina Jutkina (2013) doktoritöös näidatud tulemustega, kus *repA1* ei olnud pD2RT replikatsioonil funktsionaalne, on IS1411 elemendi insertioon *repA1* ette plasmidi pG20 puhul selle rolli muutnud. Antud töös selgus, et erinevalt teistest sama tüüpi selgrooga plasmiididest, kus on samuti kodeeritud kaks replikatsiooni initsiaatorvalku kodeerivat geeni, vastutab funktsionaalse RepA2 puudumisel replikatsiooni initsiatsiooni eest funktsionaalne RepA1.

Replication initiation of plasmid pG20 in *Pseudomonas fluorescens* strain PC20

Kadi Rõuk

SUMMARY

Pseudomonas fluorescens strain PC20 was isolated from river water polluted by phenolic leachate. Bacterial strain PC20 contains three plasmids – pNAH20, pPHE20 and pG20 (discovered lately). Plasmid pG20 has two *repA* genes, *repA1* and *repA2* which encode replication initiation proteins RepA1 and RepA2, respectively. It has been previously shown that *IS1411* is located upstream of *repA1* gene and can activate it due to outward-directed promoters. Plasmids with similar sequences (pD2RT and pGRT1) and two *repA* genes have only one active *repA* gene – *repA2*.

The aim of this study was to discover, if *repA1* is active due to insertion of *IS1411* and if RepA1 is able to initiate pG20's replication. In order to do that, I constructed two PC20 strains, where two genes in pG20 plasmid (*repA1* and *repA2*) were interrupted separately.

My experiments showed:

- *repA1* is activated due to insertion of *IS1411* and RepA1 will activate pG20 replication in the absence of functional RepA2;
- interruption of *repA1* won't affect pG20's replication in host strain PC20 if *repA2* is functional;
- interruption of *repA2* won't affect pG20's replication in host strain PC20 if *repA1* is functional.

KIRJANDUSE LOETELU

Adams, M.A., 1959. The Bacteriophages. Wiley Interscience, New York.

Bauchop, T., Elsdén, S.R., 1960. The growth of microorganisms in relation to their energy supply. J. Gen. Microbiol. 23: 469-475.

Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D., 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41: 459-472.

Chattoraj, D.K., 2000. Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. Mol. Microbiol. 37: 467-476.

Das, N., Chattoraj, D.K., 2004. Origin pairing (handcuffing) and unpairing in the control of P1 plasmid replication. Mol. Microbiol. 54: 836-849.

de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., Timmis, K.N., 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J. Bacteriol. 172: 6568-6572.

del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M., Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(2): 434-464.

Dmowski, M., Sitkiewicz, I., Ceglowski, P., 2006. Characterization of a novel partition system encoded by the delta and omega genes from the Streptococcal plasmid pSM19035. J. Bacteriol. 188(12): 4362-4372.

Ebersbach, G., Gerdes, K., 2005. Plasmid segregation mechanisms. Ann. Rev. Genet. 39: 453-479.

Fetzner, S., Kolkenbrock, S., Parschat, K., 2007. Catabolic Linear Plasmids. In: F. Meinhardt, R. Klassen, Eds., Microbial Linear Plasmids. vol. 7. Springer Berlin Heidelberg.

Figurski, D.H., Helinski, D.R., 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 76(4): 1648-1652.

Firth, N., Ippen-Ihler, K., Skurray, R.A., 1996. Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular Biology, F. Neidhardt et al., eds. (Washington D.C.: ASM) pp 2377-2382.

Gilmour, M.W., Gunton, J.E., Lawley, T.D., Taylor, D.E., 2003. Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. Molecular Microbiology. 49: 105-116.

Hayes, F., 2003. Toxins-Antitoxins: Plasmid maintenance, programmed cell death and cell cycle arrest. Science. 301: 1496-1499.

Heinaru, A., 2012. Geneetika. Õpik kõrgkoolile. Lk. 590-591. Tartu Ülikooli Kirjastus.

Heinaru, E., Merimaa, M., Viggor, S., Lehist, M., Leito, I., Truu, J., Heinaru, A., 2005. Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. FEMS Microbiol. Ecol. 51(3): 363-373.

Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U., Heinaru, A., 2000. Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol- and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. FEMS Microbiol. Ecol. 31(3): 195-205.

Heinaru, E., Vedler, E., Jutkina, J., Aava, M., Heinaru, A., 2009. Conjugal transfer and mobilization capacity of the completely sequenced naphthalene plasmid pNAH20 from multiplasmid strain *Pseudomonas fluorescens* PC20. FEMS Microbiol. Ecol. 70: 563-574.

Herrero, M., de lorenzo, V., Timmis, K.N., 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 172(11): 6557-6567.

Hõrak, R., Ilves, H., Pruunsild, P., Kuljus, M., Kivisaar, M., 2004. The ColR–ColS two-component signal transduction system is involved in regulation of Tn4652 transposition in *Pseudomonas putida* under starvation conditions. *Mol. Biol.* 54: 795-807.

Jutkina, J., 2013. The horizontal gene pool for aromatics degradation: bacterial catabolic plasmids of the Baltic Sea aquatic system. Tartu 2013, ISSN 1024-6479.

Kado, C.I., 1998. Origin and evolution of plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 117-126

Kalkum, M., Eisenbrandt, R., Lurz, R., Lanka, E., 2002. Tying rings for sex. *TIM*. 10: 382-387.

Kallastu, A., Hõrak, R., Kivisaar, M., 1998. Identification and characterization of IS1411, a new insertion sequence which causes transcriptional activation of the phenol degradation genes in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 180(20): 5306-5312.

Kasak, L., Hõrak, R., Kivisaar, M., 1997. Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: A model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(7): 3134-3139.

Mahillon, J., Chandler, M., 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 725-774.

Miller, J.H., 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour.

Molina, L., Duque, E., Gomez, M.J., Krell, T., Lacal, J., Garcia-Puente. A., Garcia, V., Matilla, M.A., Ramos, J.L., Segura, A., 2011. The pGRT1 plasmid of *Pseudomonas putida* DOT-T1E encodes functions relevant for survival under harsh conditions in the environment. *Environ. Microbiol.* 13(8): 2315-2327.

Park, K., Han, E., Paulsson, J., Chattoraj, D.K., 2001. Origin pairing (handcuffing) as a mode of negative control of P1 plasmid copy number. *The Embo Journal*. 20(24): 7323-7332.

Pavel, H., Forsman, M., Shingler, V., 1994. An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on para-substituted methyl phenols. *J. Bacteriol.* 176(24): 7550-7557.

Pemberton, J.M., Schmidt, R., 2001. Catabolic plasmids. *Encyclopedia of Life Sciences.* (John Wiley & Sons, Ltd).

Saumaa, S., Tarassova, K., Tark, M., Tover, A., Tegova, R., Kivisaar, M., 2006. Involvement of DNA mismatch repair in stationaryphase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*. *DNA Repair.* 5: 505–514.

Sengupta, M., Austin, S., 2011. Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infect. Immun.* 79(7): 2502-2509.

Smillie, C., Garcillan-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P.C., Cruz, F., 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74(3): 434-452.

Zielenkiewicz, U., Ceglowski, P., 2001. Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences.* 48: 1003-1023.

Williams, D.R., Thomas, C.M., 1992. Active partitioning of bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 138(1): 1-16.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadi Rõuk (31.08.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Plasmiidi pG20 replikatsiooni initsiatsioon tüves *Pseudomonas fluorescens* PC20

Mille juhendajad on Eve Vedler ja Merike Jõesaar,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015